

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-190192

(43)Date of publication of application : 08.07.2003

(51)Int.Cl.

A61F 2/04

A61L 27/00

(21)Application number : 2001-399126

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE &  
TECHNOLOGY CORP  
CHAMPION:KK

(22)Date of filing : 28.12.2001

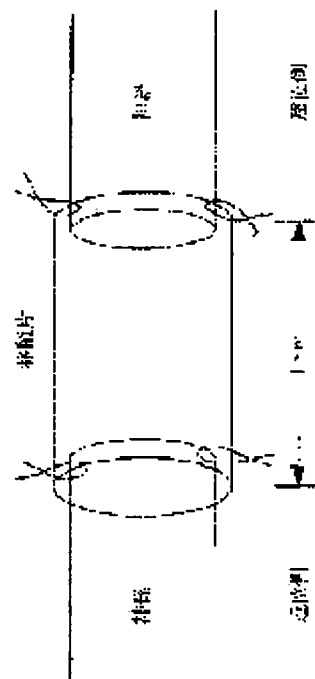
(72)Inventor : IDE KAZUTSUKA  
KIKUCHI NORIHIRO  
NAKAGAWA TOKUZO

## (54) PERIPHERAL NERVE REGENERATION METHOD

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To regenerate a peripheral nerve by transplanting an artificial neurilemma suitable for repairing the peripheral nerve cut by an accident, or the like, into an organism.

SOLUTION: A membrane obtained from the human-based amnion, or a hollow yarn or a hollow yarn bundle each obtained by using the mold of the membrane is transplanted into the organism as an artificial neurilemma and connected with the cut peripheral nerve to regenerate the peripheral nerve.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 16.12.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-190192

(P2003-190192A)

(43)公開日 平成15年7月8日(2003.7.8)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マ-ト*(参考)
A 6 1 F 2/04		A 6 1 F 2/04	4 C 0 8 1
A 6 1 L 27/00		A 6 1 L 27/00	Q 4 C 0 9 7

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 8 頁)

(21)出願番号 特願2001-399126(P2001-399126)

(22)出願日 平成13年12月28日(2001. 12. 28)

(71)出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(71)出願人 391064614

株式会社チャンピオン

栃木県上都賀郡西方町大字金井289番地5

(72)発明者 井出 千束

京都府京都市北区上賀茂畔勝町55番7号

(72)発明者 菊地 紀洋

神奈川県横浜市港北区菊名2丁目27番32号

(74)代理人 100066533

弁理士 田村 武敏

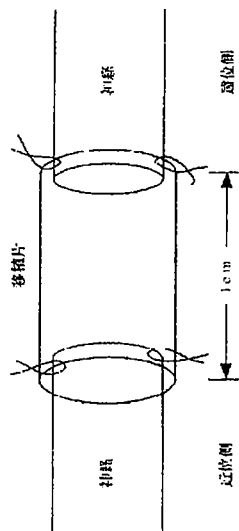
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 末梢神経再生方法

(57)【要約】

【課題】 事故等により切断した末梢神経を修復するに適した人工神経鞘を生体に移植して末梢神経の再生を図る。

【解決手段】 ヒト由来の羊膜から得られる膜材または膜材の成形体を使用した中空糸または中空糸束を人工神経鞘として生体内に移植し、切断した末梢神経とつなぎ合わせて末梢神経を再生させる。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 上皮層、基底膜層、緻密層、繊維芽細胞層にて構成される生体結合組織膜から、上皮層および繊維芽細胞層等の細胞質層を溶解、除去することにより得られる無細胞質である緻密層または緻密層および基底膜層であって、その特徴とするマトリックス構造を保全した医用材料の膜材またはその膜材を使用して得られる成形体から構成される中空糸または中空糸束を生体内に移植し、人工神経鞘として用いることを特徴とする末梢神経再生方法。

【請求項2】 人工神経鞘の材料となる膜材または膜材の成形体がヒト由来の胎児膜から得られることを特徴とする請求項1記載の末梢神経再生方法。

【請求項3】 人工神経鞘の材料となる膜材または膜材の成形体を加熱処理によりタンパク分子間に架橋反応を施してあるか、または、膜材または膜材の成形体がコラーゲンまたはゼラチンを含浸させた膜材または膜材の成形体であって、加熱処理によりそれらのタンパク分子間に架橋反応を施してあることを特徴とする請求項1記載の末梢神経再生方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は事故等により生じた末梢神経の切断部分を修復するに適した人工神経鞘を生体に移植することを特徴とする末梢神経再生法に係るものである。

## 【0002】

【従来の技術】従来、事故等により生じた末梢神経の切断により、生体に障害が残る、その後の日常生活に支障を生じることが多くあった。このような支障が生じないようにするため、切断した末梢神経を再生させ、生体機能を修復しようとする試みが種々行われている。その一つとして屍体から採取した末梢神経を移植する技術がある。この技術は免疫拒絶反応、採取した末梢神経の保存方法等、解決しなければならない重大な問題が数多くあり、まだ未解決の状態で実用化にはほど遠い現状である。

【0003】また、本人の身体の一部から採取した神経を患部へ移植する技術も一般的に用いられている。これは移植用ドナーサイトに残る傷痕、その他知覚脱失の障害が起こることがあり、好ましくはなかった。

【0004】哺乳動物の組織から抽出、精製してテロペプチッドを除去したアテロペプチッド・コラーゲンを用いる人工神経鞘を利用する末梢神経を再生させる方法が提案されている。しかしながら、この技術は以下のような問題点があり、これらの問題点はまだ解決されていないのが現状である。

① 哺乳動物が牛、羊の場合、病原体・プリオンのが残存するおそれがあり、これを不活性化または／および除去する方法が未解決である。

② テロペプチッドを除去したコラーゲンは、生体に残らない異質のコラーゲンであるから、異質コラーゲンに起因する神経の再生を阻害する各種の医科学に属する未解決の問題がある。

③ 微弱とされているが、神経の再生にとっては大問題とする抗原性の残存に関する問題が未解決である。

【0005】以上のように、末梢神経の再生を可能にする技術は種々提案されているが、材料の安定供給性、人体に対する安全性など、それぞれ重大な未解決の問題を抱えており、簡便で安定供給が可能な技術の出現が待たれているのが現状である。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】前記の現状に鑑み、従来の技術が解決できなかった種々の問題を解決し、安価で安定性に富んだ人工神経鞘を使って、切断した末梢神経を再生できる方法を提供することにより、神経の傷害者を正常な社会生活へ復帰させ得ることにある。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】上記の欠点を解決するために本発明者等は鋭意研究した結果、ヒト由来の生体結合組織膜から得られた緻密層からなる膜材またはその膜材を使用して得られる成形体を使った中空糸または中空糸束を生体内に移植することにより、末梢神経を再生できることを見だし、本発明を完成した。

【0008】すなわち、本発明の要旨とするところは、上皮層、基底膜層、緻密層、繊維芽細胞層にて構成される生体結合組織膜から、上皮層および繊維芽細胞層等の細胞質層を溶解、除去することにより得られる無細胞質である緻密層または緻密層および基底膜層であって、その特徴とするマトリックス構造を保全した医用材料の膜材またはその膜材を使用して得られる成形体から構成される中空糸または中空糸束を生体内に移植し、人工神経鞘として用いることを特徴とする末梢神経再生方法にある。

## 【0009】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明で云うヒト・哺乳動物の膜状結合組織とは、脳硬膜、心膜、胸膜、横隔膜、腹膜、大腿筋膜、腸間膜、皮膚、鼓膜、その他の生体膜、および血管壁、食道壁、気管壁、尿道・尿管壁、心臓壁、その他生体臓器の外壁、さらに胎児膜およびそれを構成する羊膜、絨毛膜等を指称するものである。これらのうち、人工神経鞘にはヒト羊膜を使用するのが好ましい。ヒト羊膜は分娩後、医療廃棄物として取扱われ、現在のところ全く用途がなく、そのうえ、出産のたびごとに採取することができ、安価に大量に原料を入手することが可能なためである。

【0010】羊膜は組織学的には上皮層、基底膜層、結合組織層の3層からなる。結合組織層は基底膜に近い部分はコラーゲン繊維が主体で、緻密層と呼ぶことができる。基底膜層の厚さはナノメートル(nm)単位で示される

超薄層であり、緻密層はマイクロメートル( $\mu\text{m}$ )単位で示すことができる厚さである。

【0011】ヒト羊膜から上皮層を除去した後に残る基底膜層の厚みは50~80nmであり、緻密層の厚みは8,000~10,000nmであって、基底膜層は非常に薄い膜層である。このように、緻密層と基底膜層では両者の厚みに極端な差があるため、以下、本発明では緻密層と基底膜層を含めて緻密層と云う。

【0012】本発明で使用する緻密層の膜状物は、一例として次のような手法で得ることができる。生体結合組織膜は緻密層よりなる膜層の両面上皮層と繊維芽細胞層等の細胞質層が存在している。これらの細胞膜は、細菌の細胞膜と同様に実質的にタンパク質である。採取された生体結合膜は、生理食塩水中で除血、脱血された後、0.1%の塩化ベンザルコニウム液中で24時間以上放置して細胞層の電位的変性を生じさせる。

【0013】次いで、pH値が中性付近の電位環境下、最もタンパク分解能を発揮するプロテアーゼなどの酵素を用い、pH7の条件で処理することにより、タンパク質層が分解される。当然のことであるが、かかるタンパク質の分解は、適当な条件で制御しなければ、コラーゲンからなる緻密層の形態をも破壊するので、適当な温度と時間を制御条件として、緻密層の形態学的条件等の保全、残存を図らなければならない。次の工程として、超音波洗浄を施す。超音波洗浄により、緻密層に付着する上皮層、繊維芽細胞層などの分解物が除去され、緻密層からなる膜状の材料を得ることができる。

【0014】このようにして得られた膜状物は、このままでも使用可能であるが、コラーゲンまたはゼラチンを含浸させ、それらのタンパク分子間に架橋反応を生起させて膜材に強度を付与することが好ましい。この処理により、膜材の強度が向上することによって、その後の操作が容易になる。

【0015】一般に、架橋反応は、コラーゲンまたはゼラチンを含浸させた膜材を紫外線照射、電子線照射、放射線照射などの物理的エネルギーを負荷することにより生起させることができるが、そのためには特別の照射装置が必要となる。また、化学的架橋はホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド等のアルデヒド類の使用が不可欠であるため、薬品の取り扱いが面倒である。本発明者等はコラーゲンまたはゼラチンを含浸させた膜状物を100~140℃、好ましくは120℃近辺に加熱することにより架橋反応を生起させることができることを見い出した。また、膜状物単独で多層積層したものを100~140℃、好ましくは120℃近辺に加熱することにより層間を接合、硬化させることができることを見い出した。後者の場合、緻密層の膜材以外のいかなる材料をも使わないため、簡単な加熱装置だけで本発明を達成することができるという優位点がある。

【0016】本発明で使用する緻密層の膜材は、それ自

体コラーゲンであるが、このコラーゲン分子内のアミノ基の全量に架橋反応を施した場合でも、十分な強度が得られないが、積層枚数を増やすか、または別途コラーゲンまたはゼラチンを含浸、付与させて架橋反応量を高め必要強度を得るようにできる。

【0017】本発明で膜材に付与するコラーゲンとは、動物由来の抽出精製したコラーゲンであって、そのテロペプチドを除去したコラーゲンを云い、かつ、好ましくはヒト由来の抽出精製したコラーゲンであって、さらに好ましくは、ヒト胎児膜由来のコラーゲンである。

【0018】本発明で膜材に付与するゼラチンとは、日本薬局方に示す注射用精製ゼラチンであって、とくに好ましくはヒト由来コラーゲンから製造する局方・注射用精製ゼラチンと同等の品質のゼラチンである。

【0019】緻密層膜材にコラーゲンまたはゼラチンを含浸させて、その後、緻密層膜のコラーゲン分子間を架橋すると同時に、含浸したコラーゲンまたはゼラチンのタンパク分子間を架橋することにより、膜材のタンパク分子間の架橋密度を極度に向上して、膜材の物理的強度を著しく強化させることができる。その結果、緻密層のみを架橋した膜材に比較して格段にその物理的強度が向上していることがわかった。

【0020】以上のようにして得られた緻密層からなる膜材を成形体にするには、膜状物を細断し、撚りを加えるなどの操作で糸状物または紐状物とすることができ、さらにこれを使用して支持棒の回りに巻きつけるか、また円形に編み立て、表面にコラーゲンまたはゼラチンを塗布して固めるかしてホース状またはチューブ状の成形体の医用材料を得ることができる。ホース状またはチューブ状の成形体の医用材料は本発明の人工神経鞘として使用することができる。

【0021】本発明で使用している膜材から中空糸または中空糸束を製造する方法の一例を示す。緻密層の膜材を表面不活性の芯材繊維に巻きつけてから、表面にコラーゲンまたはゼラチンを含浸させ、加熱して膜材の強度を向上させた後、芯材繊維を引き抜くことによって中空糸を得る。

【0022】芯材繊維は加工後、膜材から引き抜くため、膜材と親和性に乏しいものが好ましく、例えばテフロン(登録商標)繊維を使用するのが好ましい。また天然繊維は親水性であるためそのままでは不適であるが、繊維表面を撥水加工などの処理で疎水性になっていれば使用できる。繊維径はその直径が賦形される中空糸の内径となるため適度な径の繊維が選ばれる。本発明の実施態様としては、外径2mmのテフロンロッドを使用したか、これに限定されることはない。

【0023】また、芯材繊維を複数本並べ、芯材繊維の1本ごとにジグザグになるよう膜材を縫うように通し、余った膜材を芯材繊維列の片側に折り曲げて重ね合わせる。この際、芯材繊維は上下から張力をかけておく

作がやりやすい。膜材と一体となった芯材繊維を余った膜材を重ね合わせた面を上にして、ガラス板のような平面上に置き、水を噴霧して形をなじませ、風乾させる。この上からコラーゲン水溶液またはゼラチン水溶液を塗布し、十分になじませた後、120℃で24時間、熱処理してコラーゲンまたはゼラチンを硬化させた。芯材繊維を引き抜くと中空部が複数並んだスタレ状の中空糸が得られる。

【0024】以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。

【0025】

【実施例1】[膜材の調製] ヒト由来の羊膜を室温で生理食塩水を用いて繰り返し洗浄した。目視観察において除血、脱血が確認できるまで手で洗浄した。次いで、局方精製水の流水中で、周波数 40KHz、室温で12時間超音波洗浄を行った。除血、脱血後の羊膜を 0.1%局方塩化ベンザルコニウム水溶液中に浸漬し、室温で24時間静置した。次いで、0.05%アジ化ナトリウムを加えた0.01%フィシンの 0.2Mリン酸緩衝液中に浸漬し、室温で24時間静置した。これらの操作により、羊膜の上皮層、繊維芽細胞層を溶解除去した。得られた膜物を取り出し、局方精製水を流しながら、室温、周波数 40KHzで揺動しつつ超音波洗浄を行い、実質的に無細胞の緻密層からなる膜材を得た。得られた膜材を無菌の減圧乾燥機中、35℃、12時間乾燥させて、目的とする膜材を得た。

【0026】

【実施例2】(1) 中空糸の調製

外径2mmのテフロン製ロッドに実施例1で得られた膜材を湿潤状態で7～8層巻きつけた。120℃で熱風乾燥後、2%のゼラチン水溶液を塗布し、120℃、24時間加熱して架橋、硬化させた後、テフロン製ロッドを引き抜き、内径2mm、長さ90mmのチューブを得た。このチューブを長さ1cm程度に切り、移植片とした。

【0027】(2) 移植

ラットの坐骨神経から1cm弱の長さを切り取り、両断端を9-0の縫合糸を用いて上記移植片の両端に縫合した(図1)。その後、チューブの内の空気を除いた。移植後1週間から4週間の期間を観察した。

【0028】(3) 観察

ラットはグルタルアルデヒドとパラホルムアルデヒドとの混合液で固定した。移植片とともに坐骨神経を取り出し、常法通りオスミウム酸で後固定し、エタノールで脱水後エポキシ樹脂に包埋した。移植片の中間部と、移植片から5mmレベルの遠位宿主神経との2点から標本を採り、横断または縦断切片を作り、トルイジンブルー染色によって組織学的に神経の再生状態を評価した。また、必要な場合は電子顕微鏡で調べた。

【0029】2週間以降から再生軸索の伸長がはっきりと分かった。まず、ほとんどが無髄神経で、一部有髄神経が見られた。3週間からは多くの有髄神経が現れ、4

週間では有髄神経がチューブの内腔を埋めていた(図2a, 2b)。この時期は宿主側にも再生軸索が多く見られ、良好な再生であることが明らかであった(図2c, 2d)。

【0030】

【実施例3】(1) 中空糸の調製

外径2mmのテフロン製ロッドに実施例1で得られた膜材を湿潤状態で10～11層巻きつけた。120℃で熱風乾燥後、2%のゼラチン水溶液を塗布し、120℃、24時間加熱して架橋、硬化させた後、テフロン製ロッドを引き抜き、内径2mm、長さ90mmのチューブを得た。このチューブを長さ1cm程度に切り、移植片とした。

【0031】(2) 移植と観察

実施例2と同様の操作を行った。移植片の厚みが実施例2で使用したチューブと異なっていたが、ほぼ実施例2と同様の結果であった(図3a, 3b)。厚みが4～5層の相違では大きな影響はないといえる。

【0032】

【実施例4】(1) 中空糸束の調製

外径1mmのテフロン製ロッドに実施例1で得られた湿潤状態の膜材を4～5層巻きつけたものを5本束にした上から、さらに膜材を4～5層巻きつけ、120℃で熱風乾燥後、2%のゼラチン水溶液を塗布し、120℃、24時間加熱処理して架橋した後、テフロン製ロッドを引き抜き、内径1mm、長さ90mmの中空糸5本束のチューブを得た。このチューブを長さ1cm程度に切り、移植片とした。

(2) 移植と観察

実施例2と同様に操作した。再生は比較的良好であった。1mmの内径の細い管にそれぞれ神経が再生していることが観察された(図4a, 4b, 4c)。

【0033】

【発明の効果】本発明によれば、事故等により切断した末梢神経を良好に再生することができるため、障害が残る、日常生活に支障を生じている人達に対して多大な貢献をするものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】膜材から得られたチューブの移植の模式図である。

【図2】実施例2の移植3週間後の顕微鏡写真である。

図2a …… 移植片中間部の写真(90倍)

図2b …… 2aの拡大写真(360倍)

図2c …… 遠位宿主神経の写真(90倍)

図2d …… 2cの拡大写真(360倍)

【図3】実施例3の移植3週間後の顕微鏡写真である。

図3a …… 移植片中間部の写真(90倍)

図3b …… 3aの拡大写真(360倍)

【図4】実施例4の移植3週間後の顕微鏡写真である。

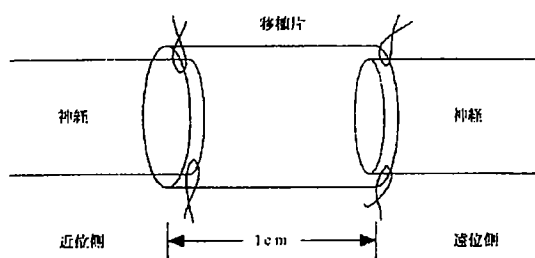
図4a …… 移植片中間部の写真(36倍)

図4b …… 4aの一部の神経束の拡大写真(180

倍)

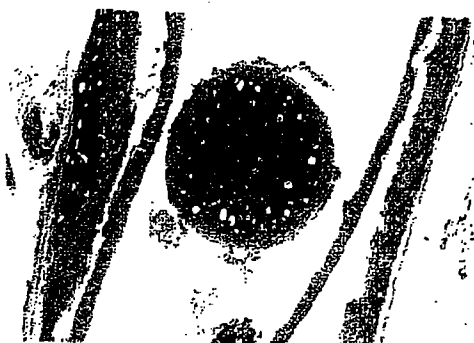
\* \* 図4 c ..... 4 bの拡大写真(360倍)

【図1】



【図2】

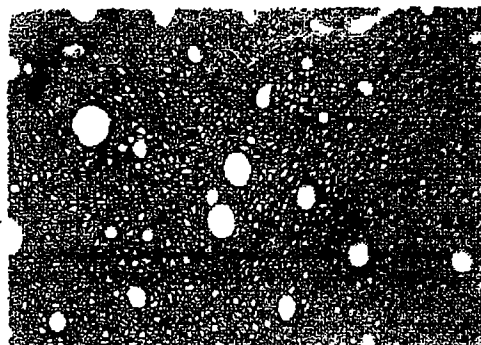
【図2 a】



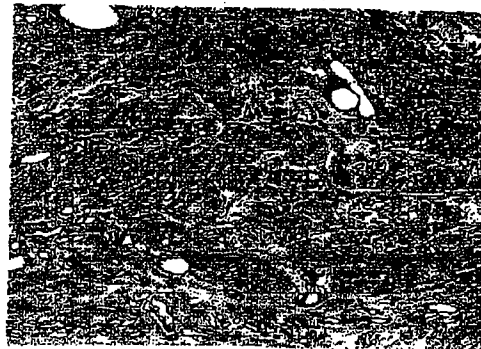
【図2 c】



【図2 b】



【図2 d】

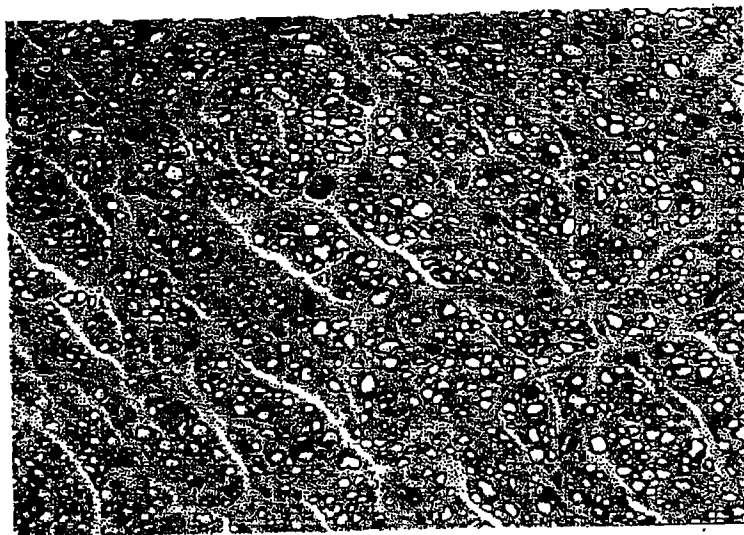


【図3】

【図3a】



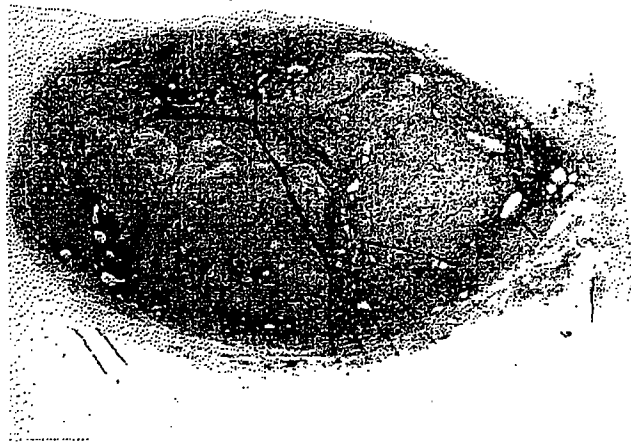
【図3b】





【図4】

[図4a]



[図4b]



[図4c]



フロントページの続き

(72)発明者 中川 徳三  
神奈川県鎌倉市西鎌倉2丁目20番10号

Fターム(参考) 4C081 AB12 BA12 BC01 CC04 CD122  
CD152 CD34 DA03 DC14  
4C097 AA14 BB01 CC01 DD15 EE18  
EE19 FF17